Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. Bauer

Autoradiographische Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit der DNS-Synthese an Zellen des Yoshida Aszitessarkoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG KNODEL
aus Stuttgart

1964

7960

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. Bauer

Autoradiographische Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit der DNS-Synthese an Zellen des Yoshida Aszitessarkoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
WOLFGANG KNODEL
aus Stuttgart

1964

Dekan: Professor Dr. H. HARMS

1. Berichterstatter: Dozent Dr. U. FEINE (Professor Dr. R. BAUER)

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. SCHNEIDER

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Inhalt

Einleitung 1
Strahlenempfindlichkeit des Teilungsvorgangs.... 5
Experimentell angewandte Materialien und Methoden 6
Autoradiographisches Verfahren 8
Fixierung und Färbung der Ausstrichpräparate ... 9
Bestrahlung 12
Versuche 13
Graphische Darstellung der Ergebnisse und
Auswertung der Kurven 14
Ergebnisse 26
Besprechung der Ergebnisse 28
Zusammenfassung 30
Schrifttum 31
Dank..... 33
Lebenslauf 34

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0016

In der Stoffwechselsteuerung der normalen wie der maligne entarteten Zelle besitzt das Genmaterial eine informative Bedeutung.

Zahlreiche Untersuchungen über Beziehungen genetischer Vorgänge mit dem Verhalten der Desoxyribonukleinsäure (DNS) im Zellkern lassen vermuten, daß solche Informationen in den Nukleotiden gespeichert sind und nach einer identischen Reduplikation des Genoms an die Tochterzellen weitergegeben werden. (1)

Einen Einblick in Stoffwechselvorgänge, die sich in einer Zelle bzw. in ihren Zellteilen abspielen, gewährt die Markierungstechnik mit Radioisotopen in Kombination mit einem autoradiographischen Nachweisverfahren. Der enge Kontakt mit einer strahlenempfindlichen Photoemulsion ermöglicht eine direkte Lokalisation der radioaktiv markierten Substanzen in der Zelle. Dies wird in hohem Maß durch die Verwendung energiearmer ß-Strahler garantiert. In der vorliegenden Arbeit soll mit 3H-markiertem Thymidin, einem DNS Stoffwechselmetaboliten, die Veränderung der Synthese in zeitlicher Abhängigkeit von einer Strahleneinwirkung verfolgt werden. Die zur Untersuchung bestimmter Zellbestandteile verwandte markierte Verbindung muß so gewählt werden, daß im Verlauf des Stoffwechsels ein selektiver Einbau erfolgt. Eine optimal gewählte spezifische Aktivität der markierten Vorstufe muß ein ausreichendes Autoradiogramm ergeben und einen möglichst geringen Einfluß auf den biologischen Vorgang ausüben.

Die eingeführte Substanzmenge und die Strahlungsenergie des Isotops hat diesen Bedingungen zu genügen.

Zwar erlaubt die Methode prinzipiell noch keine Aussage über die Vorgänge, die sich zwischen der Zugabe der markierten Substanz und ihrer endgültigen Lokalisation im Organismus abspielen. Doch gelang es, wesentliche Aussagen über das Verhalten der DNS im Verlaufe eines Teilungszyklus der Zelle zu machen.

Von Hevesy fand einen verstärkten Einbau von radioaktivem Phosphat in rasch wachsenden Geweben (2). Bei der quantitativen Analyse zeigte sich, daß bei einem Tumorwachstum auf das doppelte Gewicht die spezifische Aktivität des Phosphats auf die Hälfte gesunken war. Diese annähernde Proportionalität läßt den Schluß zu, daß bei der Zellteilung die DNS-Substanz je zur Hälfte auf die beiden Tochterzellen weitergegeben wird. Bei dem von Watson und Crick vorgeschlagenen Modell (3) stellt man sich die Polynukleotide als doppelspiralig angeordnete Pentosephosphatketten vor. Die Purin- und Pyrimidinbasen stehen senkrecht zur gemeinsamen Achse beider Spiralen. Bei der identischen Reduplikation dienen die gelösten Einzelspiralen als Matritze für die Synthese einer Tochterspirale. Diese Hypothese fand durch weitere Untersuchungen ihre Bestätigung.

Insbesondere mit der Einführung von Thymidin, das an der Methylgruppe mit Tritium markiert worden war, durch Hughes et al. (4), wurde eine experimentell sehr vielseitig verwendbare markierte DNS-Vorstufe geschaffen.

Obwohl für Riboside nicht unbedingt ein unveränderter selektiver Einbau in die Desoxyribonukleotidkette angenommen werden kann (5), bestätigen einige Untersuchungen diese Vermutung für Tritiumthymidin (6).

Reichard (7) fand markiertes Thymidin nur in der Thyminfraktion der DNS. Dies spricht für einen selektiven Einbau

der Substanz und für eine Stabilität der mit Tritium markierten Methylgruppe des Thymidins. Auch Painter (8) konnte dies für die DNS von Escherichia coli bestätigen. Einen weiteren Beweis bildet das völlige Verschwinden einer durch Tritiumthymidin in den Kern eingeführte Aktivität nach enzymatischer Behandlung mit einer Desoxyribonukleotidase (9).

Bei dem Zerfall von Tritium besitzt das ß-Teilchen eine mittlere Energie von 5,7 Kev., was einer Reichweite im Gewebe von 1 - 2 µ entspricht (9). Diese geringe Reichweite bewirkt einerseits ein für die Autoradiographie günstiges Lokalisationsvermögen (10), andererseits jedoch eine geringe Zählausbeute*), die im allgemeinen mit etwa 5 % für Ausstrichpräparate angegeben wird (11).

Die Energie der ß-Strahlung von Tritium wird auf engstem, doch für die DNS-Untersuchungen ausschlaggebendem Bereich von wenigen µ absorbiert. Aus diesem Grund untersuchte man mehrfach die intranukleare Strahlenwirkung, wobei eine Schädigung des biologischen Vorgangs nicht immer ausgeschlossen werden konnte (11, 12, 13). Nach neueren Untersuchungen Künkels (14) scheint der Versuch, diese Strahlungsenergie in den üblichen Dosiseinheiten mit einer extrakorporalen Strahlungsquelle zu vergleichen, zumindest im mikroskopischen Bereich nicht sinnvoll. In den eigenen Versuchen könnte sich die ß-Strahlung nur vom Moment des Eintritts von Tritiumthymidin in den Zellkern, zu Beginn der DNS Synthese, auswirken. Nach spätestens einer Stunde erfolgte die histologische Aufarbeitung. Von einer in diesem Zeitraum auftretenden Schädigung muß angenommen werden, daß sie die synthetisierenden Zellen gleichmäßig betrifft und dadurch die Relationen erhalten bleiben.

---

*)Unter Zählausbeute (geometric efficiency) wird der Prozentsatz an ß-Teilchen verstanden, die die sensible Filmschicht erreichen und ein Silberkorn aktivieren können.

Insbesondere die Untersuchungen von Hughes (15) mit H-3-Thymidin sicherten das Bild von der DNS-Verdopplung, deren Ablauf man sich in der Form des eingangs erwähnten Matritzenmechanismus vorstellt. Hughes fand bei Vicia faba nach der Mitose eine gleichmäßige Verteilung der Aktivität auf die Tochterchromosomen, wobei nur eine Chromatide des Paares markiert war.

Strahlenempfindlichkeit des Teilungsvorgangs

Tritiumthymidin gewährte Einblicke in Einzelheiten des Zellzyklus, die zu einer Phaseneinteilung der DNS-Synthese führten. Die der Mitosephase vorausgehende Interphase wird gewöhnlich in drei Stadien, in ein vor und nach der Synthesephase S liegendes Ruhestadium G_1 und G_2 eingeteilt (16, 17).

Durch partielle Hepatektomie kann für einige Zeit eine Synchronisation der regenerativen Zellteilungen erreicht werden (18). Sie erbrachte erst im letzten Teil der G_1-Phase einen DNS- und gleichzeitig einen Polymeraseanstieg. Die postsynthetische G_2-Phase ist durch eine beträchtliche Zunahme der Sulfhydrylgruppen gekennzeichnet (19).

Hemmwirkungen durch ionisierende Strahlung ließen sich vor allem in der praesynthetischen Phase beobachten und mit einer behinderten Polymerasebildung erklären (20). Die Desoxyribotidbildung und die Verdopplung selbst wird weit weniger gehemmt.

Eine weitere besondere Empfindlichkeit innerhalb des Teilungszyklus zeigt die Mitose, wobei wahrscheinlich eine Oxydation der Sulfhydrylgruppen und dadurch eine Blockierung der Spindelbildung stattfindet. Damit steht die gute Strahlenschutzwirkung von Cystein im Einklang.

Die strahlenbedingte Teilungshemmung ist somit binärer Genese und besteht aus einer Hemmung der DNS-Bildung in der praesynthtischen Phase einerseits und einer nicht unbedingt damit zusammenhängenden Mitosehemmung andererseits.

Experimentell angewandte Materialien und Methoden

Die Untersuchungen wurden an der als Aszitestumor wachsenden Form des Yoshida Sarkoms vorgenommen (21). Die Verlaufsform des Impftumors verdient insofern eine besondere Erwähnung, als sie von der ursprünglich beschriebenen etwas abweicht.

Um 300 g schwere Tiere eines Wistar und Druckrey-Stammes wurden jeweils 0,3 ml Aszites intraperitoneal transplantiert. Nach 5 Tagen entwickelte sich eine vergleichsweise geringe bis zum Eintritt des Todes am 7. bis 8. Tag kaum mehr zunahmende Menge (2 - 3 ml) von haemorrhagischem Aszites. Der Zellgehalt lag selten über 250.000/mm^3. Im Finalstadium war meistens ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Ikterus zu sehen. Die Transplantationsrate lag über 90 %. Die Gründe, die diese starke Malignitätszunahme bedingten, konnten noch nicht geklärt werden. Eine bakterielle Infektion darf wegen der massiven antibiotischen Behandlung mehrerer Passagen ausgeschlossen werden.

Sämtliche Versuche wurden in einem Tumoralter von 5 Tagen ausgeführt.

Zur DNS-Markierung wurde Tritiumthymidin*) verwandt (spezifische Aktivität 1,9 Curie/mMol). Die Thymidindosis wurde einmalig intraperitoneal injiziert und betrug maximal 100 µC je Tier. Vom Hersteller in einer Konzentration von 1 mC/ml geliefert, wurde die Lösung in der Injektionsspritze 1:5 mit Ringerlösung verdünnt, um eine rasche Verteilung in der Bauchhöhle zu sichern.

---

*)geliefert von Schwarz Bioresearch Inc. Mount Vernon NY USA

Eine überschlägige Berechnung soll die Mengenverhältnisse von injizierter Vorstufe und des im Verlaufe eines Zellzyklus zur DNS-Synthese benötigten Thymidins veranschaulichen.

Unter der Annahme, daß sich nur 10 % einer assynchronen Aszites Zellpopulation in der Synthesephase befänden (beim unbeeinflußten Tumor sind es etwa 35 %), würden für die Verdopplung der DNS etwa $2{,}3 \times 10^{17}$ Thyminmoleküle verbraucht. (250 000 Zellen/mm^3 Aszitesflüssigkeit; ca. 3 ml Aszites; 3×10^9 Thyminmoleküle pro Zellkern (22)).

Durch 100 µC des benutzten H3-Thymidins gelangen jedoch nur $3{,}2 \times 10^{16}$ Moleküle, also nur 1/7 der zur Synthese benötigten Menge in die Bauchhöhle, die sich ja keineswegs indifferent verhält und sicher durch Resorption ein schnelleres Verschwinden aus der Aszitesflüssigkeit herbeiführt.

Bei dem gegebenen Thyminbedarf kann demnach eine rasche Inkorporation ohne störenden Einfluß der injizierten Menge angenommen werden. Eine ungewollte Einwirkung kann auch in Analogie zu den Versuchen A. Kornbergs (23) ausgeschlossen werden. Sie ergaben eine Reduktion der DNS-Synthese auf ein Minimum, wenn eines der vier benötigten Triphosphate fehlt. Besteht also im Stoffwechsel des Aszitestumors nicht gerade ein Mangel an Thymin, so würde durch das zusätzliche Angebot von Tritiumthymidin kein nennenswerter positiver oder negativer Einfluß auf den Synthesevorgang ausgeübt werden.

Autoradiographisches Verfahren

Die Autoradiographien wurden mit der "stripping-film"-Methode von Pelc hergestellt*) (24). Um eine bessere Haftung der Filme auf dem Objektträger zu erzielen, wurden diese nach sorgfältiger Reinigung noch durch kurzes Eintauchen in eine Kaliumbichromat-Gelatinelösung mit einem hauchdünnen Gelatinefilm überzogen. Dadurch wurden Glaseffekte gedämmt und die Haftung des Films blieb auch nach ausgiebiger Wässerung bestehen. Die Objektträger waren durch diese Vorbehandlung kaum in ihrer Verwendungsfähigkeit beschränkt und auch für Ausstrichpräparate der Asziteszellen geeignet. Allerdings hielten sie einer Säurehydrolyse, wie sie die Feulgen Färbung verlangt, nicht stand. Dieser Nachteil ist leicht zu beheben durch rückseitiges Auftragen der Gelatine mit einem Glasstab nach der Färbung.

Die Expositionszeit wurde so gewählt, daß eine starke Markierung bei noch sicherer Körnchenzählung zustande kam. Dies entspricht einer durchschnittlichen Zahl von 40 Granula je markiertem Zellkern und wird beim unbeeinflußten Yoshida Sarkom mit 50 µC H^3-Thymidin und einer Expositionsdauer von 4 Tagen erreicht.

Nach Ablauf der Expositionszeit wurden die Autoradiographien mit Kodak Entwickler D19b entwickelt (7 Minuten bei 19°C), kurz gewässert und anschließend 5 Minuten bei 19°C fixiert. Der Gelatineüberzug erlaubte eine anschließende weitere Wässerung von mindestens 10 Minuten.

---

*)mit Kodak Ltd AR 10 Film

Fixierung und Färbung der Ausstrichpräparate

Für sämtliche Färbungen erschien eine Fixierung der luft-trockenen Ausstriche mit Äthylalkohol von 2 bis 3 Minuten mit nachfolgender kurzer Wässerung am zweckmäßigsten.

Grundsätzlich sind 2 Färbemethoden möglich:

1. Eine Färbung kann vor dem Überziehen mit dem stripping film erfolgen, wie die Feulgen Färbung. Eine solche Methode ist allerdings nur zulässig, wenn sie die photographischen Prozesse unverändert übersteht und keinen chemographischen Einfluß auf den Film ausübt.

2. Erfolgt die Färbung durch den Film hindurch, hat sie die gleichen Forderungen zu erfüllen. Vor allem dürfen die Silbergranula nicht herausgelöst werden, wie dies bei der Kernfärbung nach Weigert der Fall ist.

Die Untersuchungen an der DNS verlangen auf jeden Fall eine deutliche Kernfärbung.

Im Folgenden wurde eine Feulgen Färbung, die Haemalaunfärbung nach P. Mayer und die Giemsafärbung angewandt, wobei letztere nur die Kern-Plasmagrenzen gut zur Darstellung bringt. Die Eosinkomponente der Farblösung dringt nicht durch den Film und Strukturen des Kerns sind schlecht zu beurteilen.

Als ideale DNS-Darstellung bietet sich die histochemische Reaktion nach Feulgen an. Bei Anwendung der standardisierten Vorschrift (25) stellten sich bei den Vorversuchen Schwierigkeiten ein, die keine ausreichenden Ergebnisse erzielen ließen. Schließlich zeigte sich bei der Durchprüfung verschiedener Farbstoffe, daß eine Reihe davon für das Verfahren als ungeeignet ausschieden. Am brauchbarsten blieb Pararosanilin

Chlorhydrat der Firma Chroma. Es zeichnete sich durch eine gute Löslichkeit aus. Die Zusammensetzung des Schiffschen Reagenz wurde mehrmals variiert und an alkoholfixierten Ausstrichen erprobt, bis sich folgendes Verfahren als geeignet erwies (26).

Zusammensetzung des Schiffschen Reagenz:

0,5 g Pararosanilin Chlorhydrat
1,0 g Kaliummetabisulfit
90 ml aqua dest
10 ml n-HCL

Der Farbstoff wurde möglichst fein pulverisiert. Er ist dann in der angegebenen Wassermenge auch kalt vollständig löslich. Nach dem Zusatz von normaler Salzsäure und Kaliumetabisulfit wird die Lösung in der üblichen Weise 12 bis 24 Stunden gelagert (lichtgeschützt, bei Kühlschranktemperatur in einer Schliffstopfenflasche). Anschließend wird der Ansatz mit 100 mg Aktivkohle 1 Minute geschüttelt und mittels Vakuum filtriert, um eine rasche Trennung zu erreichen. Das fertige Reagenz wird dann luft- und lichtdicht bei 5^{o}C aufbewahrt. Zur besseren Konservierung des SO_2Gehalts kann es mit Benzol oder einer anderen indifferenten Flüssigkeit überschichtet werden (26).

Optimale Färbungen wurden bei einer Hydrolysezeit von 3 bis 4 Minuten erzielt. Die in normaler Salzsäure hydrolysierten Ausstriche verblieben 1 bis 2 Stunden im Schiffschen Reagenz und wurden dann mit einer SO_2haltigen Flüssigkeit ausgewaschen (25). Für das folgende autoradiographische Verfahren ist abschließend eine gute Wässerung, besser noch eine Pufferung mit einem Neutralpuffer nötig.

Die Nachteile der Feulgen Färbung liegen im kaum zu vermeidenden DNS-Verlust durch die Hydrolyse und in der umständlichen Verfahrensweise.

In der Hämalaunfärbung nach Mayer bietet sich eine einfache und für den geforderten Zweck leistungsgleiche Ersatzmethode an. Die Autoradiographien kommen nach dem photographischen Prozeß 15 Minuten in die Hämalaunlösung, werden kurz gewässert, dann in Natriumbicarbonatlösung (1 %) 5 Minuten gebläut und nochmals etwa 3 bis 5 Minuten gewässert. Durch dieses Verfahren wird eine ausreichende Kernfärbung erzielt, die die Beurteilung der mitotischen Strukturveränderungen erlaubt und außerdem gegenüber der Feulgen Färbung den Vorteil einer leichten Mitanfärbung des Plasmas besitzt.

Bestrahlung

Die Bestrahlung erfolgte mit schnellen Elektronen bei einer Energie von 17 MeV. Die 80 % Isodose reichte bis in eine Tiefe von 4 cm. Dadurch wurde eine weitgehend homogene Bestrahlung des Bauchraumes gewährleistet, wobei die applizierte Dosis zwischen 1000 und 800 r lag.

Die Ruhigstellung der Versuchstiere erfolgte durch Äthernarkose oder durch ein intramuskulär gespritztes Barbituratgemisch (0,3 mg Atropin, 3 mg Veronal, 8 mg Nembutal pro ml 0,9 % Kochsalzlösung). Letzteres hat den Vorteil einer guten Dosierbarkeit (durch die Injektion 0,0025 ml/g Tiergewicht wird gerade eine Ruhigstellung der Tiere erreicht). Der Nachteil gegenüber der Äthernarkose liegt in einer längeren Wirkungsdauer. Die erhaltenen Versuchsergebnisse erwecken nicht den Eindruck einer Beeinflussung durch die Art des verwendeten Narkosemittels. Um jedoch Fehlerquellen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde jedem bestrahlten Tier ein gleichschweres Kontrolltier zugeordnet, das bis auf die Bestrahlung den genau gleichen Versuchsbedingungen (Narkose, Einführung der markierten Substanz, Punktion des Aszites) ausgesetzt war. Auch die Aszitesausstriche von Versuchs- und Kontrolltier wurden bis zur fertigen Autoradiographie gleichzeitig denselben Prozessen unterworfen.

Versuche

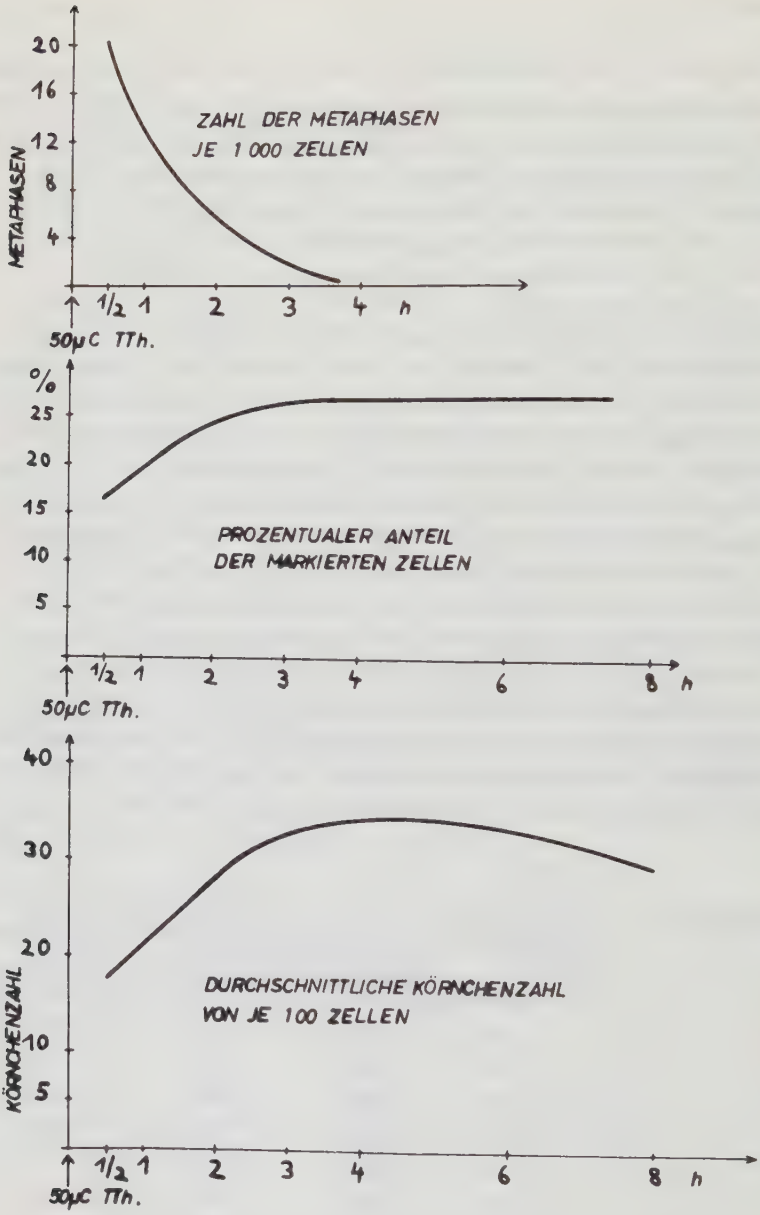
Zur Reduktion der Fehlerquellen und zur Versuchsvereinfachung führt ein in vitro angeordneter Aufbau. Die im Aszites suspendierten Tumorzellen scheinen dafür besonders geeignet zu sein. Zur Überprüfung, ob die Zellen in vitro tatsächlich ihre Vitalität längere Zeit behalten, war die DNS-Inkorporation und die Mitoseaktivität als besonders sensibler Indikator an den in vitro inkubierten Asziteszellen zu untersuchen.

In sorgfältig paraffinierten Erlenmeyerkölbchen (Fassungsvermögen etwa 5 ml) wurde 1 ml Aszites und 1 ml Ringerlösung sofort nach der Entnahme bei 37°C inkubiert. Eine Schaukelvorrichtung, die sich langsam mit einer Schwingung in etwa 1 Sekunde bewegte, verhinderte die Sedimentation der Zellen. Gleich nach der Punktion wurden 17 µC Tritiumthymidin zugegeben. In Abständen von 1/2, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Stunden nach der Punktion wurde mit einem paraffinierten Glasstab ein Tropfen der inkubierten Flüssigkeit entnommen und ein Ausstrichpräparat für die Autoradiographie angefertigt. An den erhaltenen Autoradiogrammen ließ sich dann jeweils die durchschnittliche Körnchenzahl auszählen und die Markierungsrate von 2000 an verschiedenen Stellen des Präparats gemusterten Zellen bestimmen. Die Größe der Mitoseaktivität entspricht der Zahl der Metaphasen pro 1000 Zellen.

Ergebnisse

Zeit nach 3H-Thymidin zugabe	Prozent. Anteil der markierten Zellen	Durchschn. Körnchenz. von je 100 Zellen	Zahl der Metaphasen von je 1000 Zellen
1/2 h	17,0	17,5	2,0
1 h	19,8	20,9	0,7
2 h	24,5	28,4	0,7
3 h	28,2	34,9	0,3
4 h	25,0	30,0	-
6 h	26,9	25,3	-
8 h	27,1	29,8	-

Graphische Darstellung der Ergebnisse



Auswertung der Kurven

Nach einem anfänglichen Anstieg, der bei etwa 3 Stunden sein Maximum erreicht, bleibt die Körnchenzahl und die davon nicht unabhängige prozentuale Markierung auf einem bestimmten Niveau erhalten, während die Mitosen schon nach 2 Stunden deutlich verändert sind. Dies ist am auffälligsten an den gequollenen Chromosomen der Metaphase sichtbar. Nach 3 bis 4 Stunden läßt sich keine Metaphase mehr finden, was deutlich zeigt, daß zumindest diese Phase des Zellzyklus durch die Versuchsbedingungen langsam zunehmend geschädigt wird. Das Konstantbleiben der Körnchenzahl zeigt ebenfalls, daß keine Teilungen mehr stattfinden. Da in einem analogen in vivo Versuch die Zellen die maximale Markierung schon nach 2 Stunden erreichen und nach 4 bis 5 Stunden markierte Metaphasen auftreten, müßte die durchschnittliche Körnchenzahl pro Zelle infolge Zellteilung abnehmen.

Einen Anhaltspunkt über das Ausmaß der Syntheseschädigung bzw. der Inkorporationshemmung läßt sich dabei noch nicht gewinnen. Doch kann eine solche Schädigung auf Grund der Mitosehemmung vermutet werden. Letztere ist innerhalb der ersten 3 bis 4 Stunden das einzige Zeichen einer Zellschädigung. Die sonst üblichen Anzeichen wie Chromatinverdichtung und -verklumpung treten sehr viel später, nach 6 bis 8 Stunden auf. Gibt man jedoch in einem Parallelversuch das Tritiumthymidin erst nach einer 3-stündigen Inkubation hinzu, zu einem Zeitpunkt, an dem die Mitosen schon beträchtlich gehemmt sind, so wird auch das Ausmaß der DNS-Syntheseschädigung augenfällig. Die Markierungsrate solcher Präparate lag etwa im Bereich von 1 ‰. Aus diesen Gründen wurde von einer weiteren Verfolgung der in vitro Versuche abgesehen.

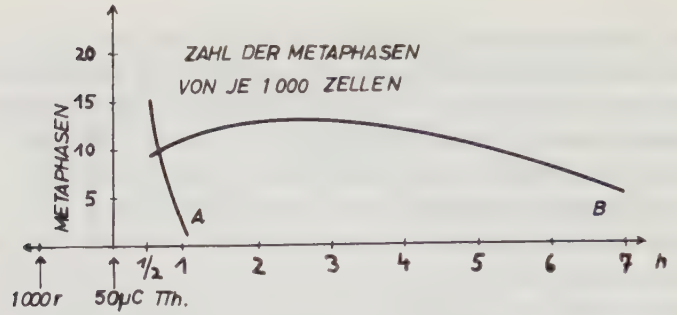
Mit diesem Versuch kann aber auch eine sogenannte "endständige" Markierung unwahrscheinlich gemacht werden (27). Die endständige Markierung, in der Literatur mehrfach gefordert, soll an nicht proliferierenden Zellen durch Anlagerung eines Desoxyribosids an die Nukleotidkette stattfinden. Auf diese Weise könnte sie unabhängig von der Zellvitalität eine durch tatsächliche Synthese bedingte Markierung vortäuschen. Dies ist bei den erzielten Versuchsergebnissen eindeutig nicht der Fall. Die Masse der Zellen blieb ohne jede Markierung, bei den wenigen markierten Zellen spricht das Ausmaß der Markierung gegen eine endständige Anlagerung von Tritiumthymidin.

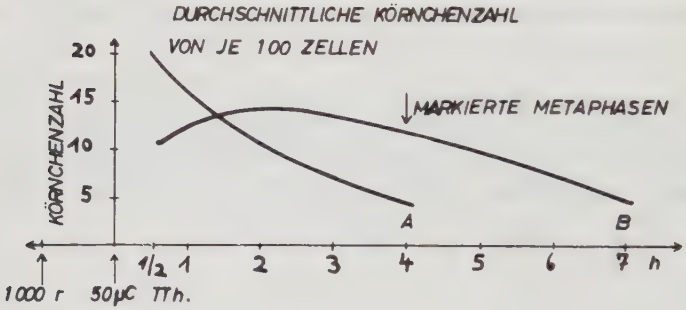
Der folgende Versuch sollte klären, wie sich eine einmalig gegebene und inkorporierte Tritiumthymidinmenge im zeitlichen Verlauf verändert. In Analogie zu dem in vitro durchgeführten Versuch wurden 50 µC Tritiumthymidin einem Kontrolltier und einem mit 1000 r bestrahlten Tier intraperitoneal gespritzt, der Aszites stündlich punktiert und autoradiographisch untersucht.

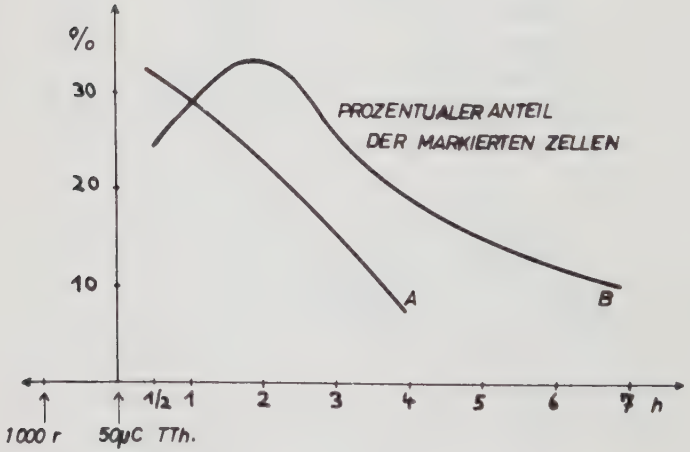
Ergebnisse

Zeit nach 3H-Thymidin zugabe	Prozent. Anteil der markierten Zellen		Durchschn. Körnchenz von je 100 Zellen		Zahl der Metaphas. von je 1000 Zellen	
	Versuchstier	Kontrolltier	Versuchstier	Kontrolltier	Versuchstier	Kontrolltier
1/2 h	31,9	24,6	19,8	11,2	1,5	1,2
1 h	27,0	27,3	11,1	10,3	0,1	0,8
2 h	11,2	33,6	23,3	14,5	-	1,3
3 h	8,5	25,5	21,3	8,7	-	1,5
4 h	4,6	15,4	7,2	10,2	-	1,2
5 h	+	14,4	+	9,7	+	0,7
6 h		15,8		9,1		0,5
7 h		8,6		4,6		0,8

Graphische Darstellung der Ergebnisse





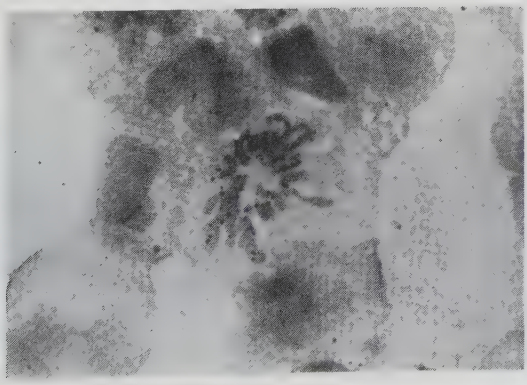


Auswertung der Kurven

Beim bestrahlten Tier ist ein mit Zelluntergang einhergehender rascher Abfall der durchschnittlichen Körnchenzahl und ein noch rascheres Verschwinden der Mitosen charakteristisch, während beim unbestrahlten Tier diese Werte nach anfänglich noch geringer Zunahme über längere Zeit hinweg Konstanz aufweisen.

Nach 2 Stunden erreicht die Markierung ihr Maximum. Nach 4 Stunden treten im Kontrolltier die ersten markierten Metaphasen auf (Abb. 1). Dies bedeutet eine Mindestlänge der postsynthetischen G_2 Ruhepause von 4 Stunden. Den Tritiumindex, der den Prozentsatz der markierten in Bezug auf alle Interphasenkerne angibt, müßte man, infolge der endlichen Einwirkungsdauer von Tritiumthymidin, mit 20 bis 25 % annehmen. Es war nicht möglich die Synthesezeit zu bestimmen, weil das Auftreten von unmarkierten Metaphasen nicht abgewartet werden konnte. Wenn der Aszitestumor ein punktionsfähiges Alter erreicht hat, verschlechtert sich der Zustand der Tiere durch die fortlaufenden Entnahmen, vielleicht durch eine inzwischen eingetretene Infektion so sehr, daß auch eine Störung der Zellproliferation angenommen werden muß. In diesem Zusammenhang dürfte auch die rasche Abnahme der Markierungsrate eine Erklärung finden.

Abb. 1



Im nächsten etwas umfangreicher angelegten Versuch soll die Tritiumthymidininkorporationsfähigkeit der Aszitesezellen in verschiedenen Zeitabständen nach einer Bestrahlung von 1000 r untersucht werden. Die Dosis wurde gewählt, weil nach Angaben aus der Literatur (29) die Strahlungsschädigung der DNS bei 1000 r ein Ausmaß erreicht, welches sich bei einer Steigerung auf die 50- bis 100-fache Dosis nicht mehr wesentlich ändert. Ein eigener Versuch bewies ebenfalls, daß eine Verdoppelung der Dosis auf 2000 r die Ergebnisse nicht signifikant beeinflußte.

In Abständen von 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde Tritiumthymidin i.p. gespritzt, 1 Stunde später der Aszites zur Herstellung der Autoradiographie punktiert. An jedem Meßpunkt kamen 3 bis 4 Tiere und ebensoviele Kontrolltiere in den Versuch.

Um freier von geringfügigen Veränderungen der gespritzten Aktivität und der Expositionszeit im Laufe der Versuchsreihe zu sein, wurde als Meßwert der Quotient von Versuchs- und Kontrolltier bestimmt.

Nicht unabhängig von den die Höhe der Körnchenzahl bestimmenden Faktoren, ist die prozentuale Markierung. Zu diesen Faktoren ist als Versuchsgröße vornehmlich die Aktivitätsmenge zu rechnen. Aber schon die Reduktion der Körnchenzahl durch eine Bestrahlung birgt bei sonst völlig gleichen Versuchsgrößen einen Fehler in sich. Zur Veranschaulichung kann folgendes Modell dienen. Bei der Erprobung der Feulgen Färbung wurde von einem, in der üblichen Weise mit Tritiumthymidin behandelten, Aszites eine Autoradiographie mit eben dieser Färbung und parallel dazu mit einer Hämalaunfärbung hergestellt. Bei gleichem Nulleffekt müßten beide Präparate eine gleich hohe prozentuale Markierungsrate aufweisen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Die durchschnittliche Körnchenzahl der

Feulgen Färbung war durch die Hydrolyse um 60 % gegenüber der des Hämalaunpräparats gesunken. Dies entspricht einem Unterschied, wie ihn ein bestrahltes und ein Kontrolltier zeigen kann. Die prozentuale Markierungsrate sank dadurch um 9 %. Aus diesen Gründen ist bei der Markierungsrate mit weitaus größerer Varianz zu rechnen. Die Kurven machen aber trotzdem deutlich, daß die Aufnahmefähigkeit für Tritiumthymidin langsam absinkt und nach 3 Stunden auf einem Minimum angelangt ist. (Abb.2 und Abb.3 Kontrolle)

Die Depression setzt im Vergleich zu der Mitoseschädigung wesentlich verzögert ein. Obwohl sich der Mittelwert bei 24 Stunden in den Kurvenverlauf einbeziehen läßt, ist die Streuung so groß, daß auch eine zu diesem Zeitpunkt überschießend einsetzende Reaktion denkbar erscheint.

Das allmähliche Sistieren der DNS Synthese läßt nicht nur eine direkte Schädigung des Verdopplungsvorgangs vermuten. Vielmehr muß auch angenommen werden, daß die präsynthetische Ruhepause G_1, die durch einen vorbereitenden Enzymanstieg charakterisiert ist, erheblich gehemmt wird.

Neben der Darstellung der durchschnittlichen Körnchenzahl ist es auch möglich die, den einzelnen Messpunkten entsprechenden, Histogramme graphisch aufzutragen und die Strahlenwirkung auf diese Weise zu vergleichen. Deshalb wurde das Körnchenspektrum von 100 Zellen in Gruppen von jeweils 5 aufeinanderfolgenden Körnchenzahlen unterteilt und die einzelnen Größenklassen in einer kumulierten Verteilungskurve dargestellt.

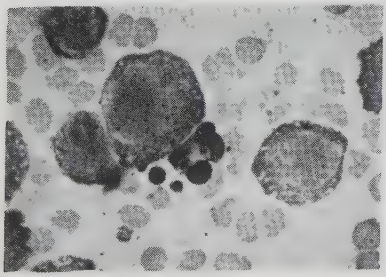


Abb. 2

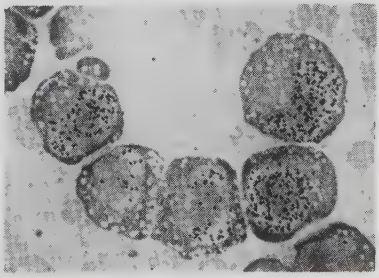


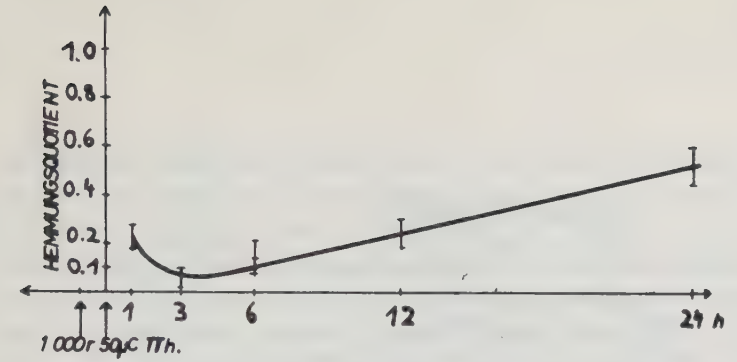
Abb. 3 (Kontrolle)

Ergebnisse

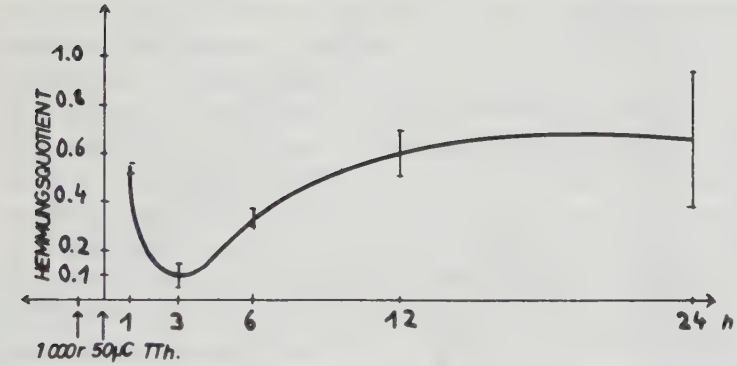
Zeit der 3H-Thymidin zugabe nach Bestrahlung	Prozent. Anteil der markierten Zellen		Durchschn. Körnchenzahl v. je 100 Z.		Zahl d. Metaphasen v. je 1000 Zellen	
	Versuchstier	Kontrolltier	Versuchstier	Kontrolltier	Versuchstier	Kontrolltier
1 h	39,2	32,8	22,0	42,9	0,1	1,8
1 h	15,0	28,4	21,0	39,5	0,4	1,5
3 h	7,5	30,0	5,6	82,8	0,1	1,6
	8,0	30,0	3,7	82,8	0,01	1,6
	18,5	50,7	8,7	98,1	0,2	2,1
	13,8	45,8	7,6	79,5	0,1	1,7
6 h	22,9	38,3	12,1	31,8	0,2	1,0
	7,8	28,4	12,4	39,5	0,1	1,5
12 h	19,0	40,0	36,9	63,0	0,2	1,1
	7,5	17,2	5,5	7,9	0,2	0,8
	18,4	24,0	9,7	18,7	0,3	1,0
24 h	18,1	31,8	19,6	55,1	0,8	1,6
	13,8	16,1	28,0	29,6	0,6	1,0
	19,2	21,7	55,6	61,0	0,5	1,0
1 h 2000 r	33,1	32,8	22,4	42,9	0,1	1,8

Verteilung der Körnchenzahl in 100 Zellkernen

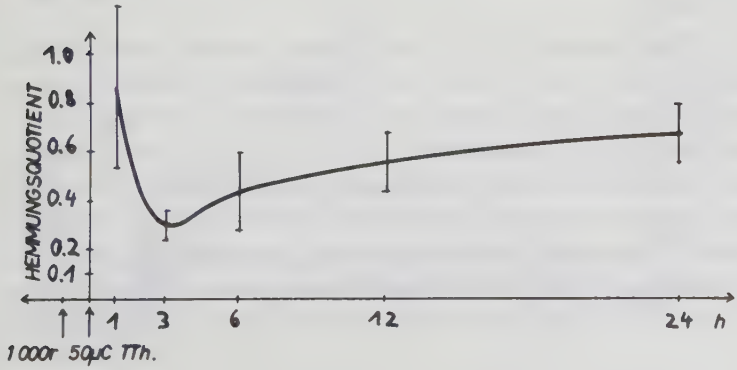
Zeit nach 3H-Thymidin zugabe	Körnzahl je Zelle	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
3 h	Anzahl der Kerne	32	33	26	9																
6 h		26	5	40	18	8	3														
12 h		8	13	19	7	18	8	8	7	9	3										
Kontrolle			4	2	2	4	5	2	2	7	5	3	8	2	13	10	5	6	3	9	4



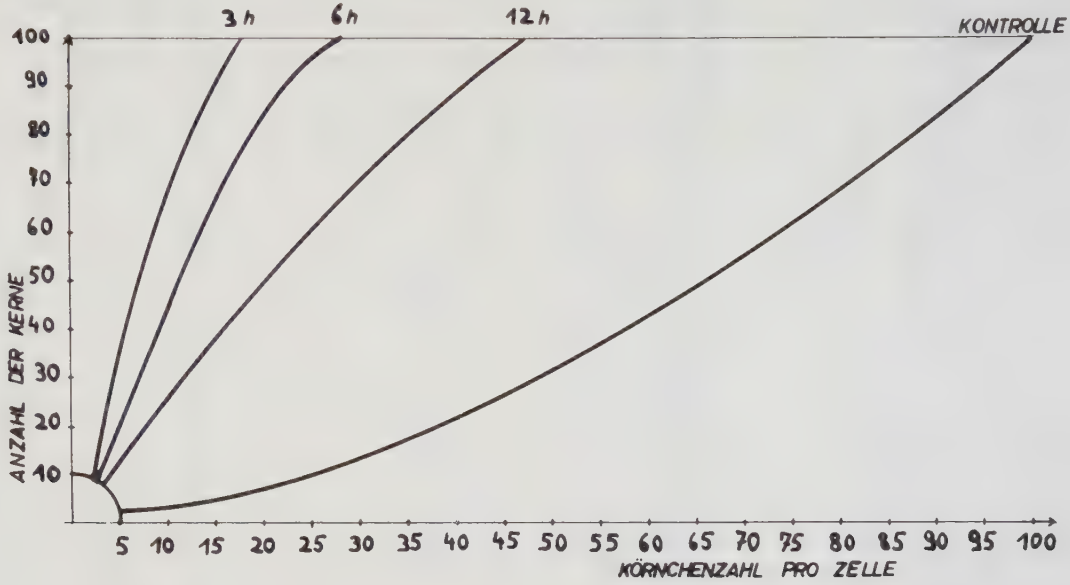
Zahl der Mitosen je 1000 Zellen im Verhältnis zum Kontrolltier



Durchschnittliche Körnchenzahl je 100 Zellen im Verhältnis zum Kontrolltier



Prozentualer Anteil der markierten Zellen im Verhältnis zum Kontrolltier



Verteilung der Körnchenzahl in 100 Zellkernen

Versuch zur möglichen Auswirkung einer Verdünnung der markierten Substanz infolge Freisetzens von Nukleinsäuren.

Die bei 3-stündig in vitro inkubiertem Aszites ausgebliebene Markierung, die hier auf eine langsam zunehmende Zellschädigung zurückgeführt wurde, könnte nach der Auffassung Lajthas (28) auch einem Verdünnungseffekt entsprechen. Lajtha nimmt an, daß beispielsweise der durch Bestrahlung ausgelöste Zellzerfall, Nukleinsäuren frei werden läßt, die eine Verdünnung der markierten Substanz und damit eine verminderte Markierung bedingen. Diese Vermutung wurde in einem Verdünnungsversuch nachgeprüft. Entsprechend den Angaben Lajthas, wurde die normalerweise verwandte spezifische Aktivität des Tritiumthymidins von 1,9 C/mM auf eine spezifische Aktivität von 0,03 C/mM mit einer inaktiven Thymidinträgersubstanz verdünnt. Wird von diesem Stoff die übliche Dosis von 50 µC pro Tier gegeben, so zeigt sich, wieder unter der Annahme, daß 3×10^9 Thyminmoleküle pro Kern und Teilungszyklus verbraucht werden und unter den eingangs schon erwähnten Aszitesdaten, daß die applizierte Tritiumthymidinmenge etwa so groß ist, wie die gesamte Asziteszellpopulation in einem Zyklus inkorporieren würde. Eine längere Verweildauer der Markiersubstanz in der Aszitesflüssigkeit und eine geringere Markierung müßte die Folge sein.

Im folgenden Versuch wurde nun je ein bestrahltes Tier und ein gleichschweres Kontrolltier mit 50 µC Tritiumthymidin (spez.Aktivität 0,03 C/mM) intraperitoneal gespritzt und im Abstand von 1/2, 1, 2, 3 und 4 Stunden Ausstrichpräparate angefertigt. Wesentlich war ferner, daß das aktive Tritiumthymidin 3 Stunden nach Bestrahlung zugegeben wurde zu einem Zeitpunkt, in dem die strahlenbedingte Hemmung des Tritiumthymidineinbaus am ausgeprägtesten ist und damit der Verdünnungseffekt am hochgradigsten sein müßte.

Ergebnisse:

Im Aszitesausstrich des bestrahlten wie des unbestrahlten Tieres wird eine das übliche Maß weit übersteigende "background" Markierung gefunden. Ein Unterschied der Markierungsstärke in dem bestrahlten und unbestrahlten Präparat kann in den ersten beiden Stunden nicht festgestellt werden. In den Punktionen nach der 3. und 4. Stunde ist ein Rückgang des Schleiers zu beobachten. Auch eine Auszählung der Körnchen pro Flächeneinheit mit einem Okularraster ergab nach der 1. Stunde zahlenmäßig keinen Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Aszites. Nach 4 Stunden war der Background im unbestrahlten Ausstrich auf ein Viertel, beim bestrahlten auf die Hälfte der ursprünglichen Werte abgesunken. Zellmarkierungen waren nicht zu erkennen, so daß solche höchstens in der Größenordnung des Schleiers liegen könnten.

Zweifellos bedingt die geringere spezifische Aktivität, d.h. die wesentlich größere Thymidinmenge eine schwächere Markierung, aber in keinem Versuch, der mit der üblichen spezifischen Aktivität von 1,9 C/mM durchgeführt wurde, war zu der Punktionszeit (1 Stunde nach Applikation der markierten Vorstufe) ein derart kräftiger background Schleier festzustellen, welcher nur auf die Aktivität im Plasma zurückgeführt werden kann. Auch bei einer geringeren Verdünnung mit einer spezifischen Aktivität von 0,36 C/mMol, anstatt 0,03 C/mMol, war es nicht möglich, den von Lajtha geforderten " pool dilution effect " nachzuweisen. Mit dieser spezifischen Aktivität konnte bei gleichbleibender Gesamtaktivität der Schleier nahezu unterdrückt und so die Präparate differenziert werden. Die durchschnittliche Körnchenzahl der Aszitezellen bestrahlter Tiere betrug 6 Granula bei der niederen und 3 bei der hohen spez. Aktivität (1,9 C/mMol). Diesen nicht signifikanten Unterschied bedingt der leichte Schleier. Mit 7,5 % und 4 % unterschied sich die prozentuale

Markierung entsprechend. Die durchschnittliche Körnchenzahl der Aszitеszellen der Kontrolltiere war mit je 27 Granula gleichhoch. Die prozentuale Markierungsrate unterschied sich mit 22 % zu 30 % bei der hohen spez. Aktivität geringfügig. Eine den spezifischen Aktivitäten entsprechende Markierung kann wegen der unterschiedlichen Gesamtthymidinmenge und der dadurch variierenden Verweildauer nicht erwartet werden. Aus diesen Versuchen ist also nicht anzunehmen, daß die Ergebnisse durch eine kariolytisch bedingte Nukleinsäure-anreicherung wesentlich verfälscht oder vorgetäuscht werden.

Lajtha führte die Verdünnungsversuche in vitro durch. Bei unseren in vivo Versuchen müßte es zusätzlich zu einer starken Resorption der Bruchstücke aus der Bauchhöhle in den übrigen Körper kommen, so daß ein Verdünnungseffekt auch aus diesem Grund unwahrscheinlich ist.

Besprechung der Ergebnisse

Die vorliegenden Versuche sollten die Veränderungen der DNS-Synthese von Asziteszellen des Yoshida-Sarkoms in zeitlicher Abhängigkeit von einer einmaligen Bestrahlung zeigen.

Ein Versuch mit in vitro inkubierten Asziteszellen mußte aufgegeben werden, nachdem sich herausstellte, daß die Zellen nach 2 - 3 Stunden ohne eine zusätzliche Noxe ihre Vitalität zunehmend verloren und kein Tritiumthymidin mehr inkorporierten.

In dem in vivo Versuch erzeugten 1 000 r nach einer Stunde nur eine geringe Hemmwirkung auf die Utilisation von Tritiumthymidin in der Zelle. Die DNS-Synthese scheint demnach nicht generell gehemmt zu werden. Auch eine sich praktisch gleich auswirkende Verdopplung der Strahlendosis erlaubt eine Deutung in diesem Sinne. Die Annahme, daß bei der hier vorliegenden asynchronen Zellpopulation eine besonders strahlenempfindliche Phase vor der Neubildung der Nukleinsäureketten einen bestimmten Anteil der Zellen von der Tr.thymidinutilisation ausschaltet, scheint gerechtfertigt. Dies würde übereinstimmen mit den Untersuchungen anderer Autoren (20), die eine Schädigung an Zellen mit synchronem Teilungszyklus in die G_1 Phase lokalisieren konnten. Nach etwa 3 Stunden bildet sich jedoch eine Beeinträchtigung der Zellvitalität aus, die, ersichtlich aus dem Histogramm, alle Zellen ziemlich gleichmäßig an einer Tr.thymidininkorporation hindert und sich nur langsam über Stunden zurückbildet. Man ist gezwungen, nicht nur eine Ausschaltung der G_1 Phase, beispielsweise durch eine Polymeraseinaktivierung, anzunehmen, sondern auch eine allgemeine Hemmung der Tr.thymidinaufnahme in die Zelle. Ein Phänomen, das der Beobachtung von Beltz, Lancker und Potter (30) entsprechen würde, die an der Rattenleber nach einer Bestrahlung vor der durch partielle Hepatektomie induzierten Regeneration ebenfalls einen totalen Hemmeffekt

beobachteten. Der Nachweis, daß dieser Effekt nicht durch eine Verdünnung der markierten Vorstufe mit Bruchstücken von Nukleinsäureketten vorgetäuscht wird, konnte im Sinne eines Modells durch Versuche mit verschieden hoher spezifischer Aktivität bei stets gleich hoch verabrechter Gesamtaktivität erbracht werden.

Zusammenfassung

1. Mit Pararosanilinchlorhydrat wurde für eine brauchbare Färbung nach Feulgen eine geeignete Zusammensetzung des Schiff'schen Reagenz erprobt und eine optimale Hydrolysezeit für Zellausstriche des Yoshida Aszites-sarkoms bestimmt.

2. In vitro suspendierte Aszitezellen können mit einer einfachen Inkubationsmethode nach 2 - 3 Stunden Tritiumthymidin infolge allgemeiner Zellschädigung nicht mehr utilisieren.

3. Die längere Beobachtung einer in vivo mit Tritiumthymidin behandelten Aszitezellpopulation ergab eine Dauer der G_2 Ruhephase von etwa 3 Stunden.

4. Eine Bestrahlung mit 1 000 r (abdominal) hemmte die Tritiumthymidininkorporation in die DNS nach 3 Stunden am ausgeprägtesten. In gleicher Weise erlosch die Mitosetätigkeit. Es wird eine vorwiegende Schädigung der Ruhephasen G_1 und G_2 angenommen. Die doppelte Dosis (2 000 r) ergab keine unterschiedlichen Ergebnisse.

5. Autoradiogramme, die von bestrahltem Aszites unter Verwendung einer geringeren spezifischen Aktivität, bei gleichbleibender Gesamtaktivität des Tritiumthymidins, hergestellt wurden, unterscheiden sich nicht von Autoradiogrammen der Bestrahlungsserie. Die Synthesehemmung ist demnach nicht von dem Thymidinangebot abhängig. Eine Vortäuschung der Ergebnisse durch strahlenbedingten Nukleinsäurezerfall wird dadurch unwahrscheinlich.

Schrifttum

1. R.L. Sinsheimer Science, 125, (1957): 1123

2. G. von Hevesy, Radioactive Indicators. Their Application in Biochemistry, Animal Physiology and Pathology. New York - London 1948

3. J.D. Watson, F.H.C. Crick Nature, 171, (1953): 964

4. W.L. Hughes, V.P. Bond, G. Brecher, E.P. Cronkite, R.B. Painter, H. Quastler and F.G. Sherman, Proc. Natl.Acad.Sci.U.S., 44, (1958): 476

5. F. Schlenk in Chargaff and Davidson, The Nucleic Acids Bd.II, (1955): 327 New York Academic Press

6. M. Friedkin, D. Tilson, D. Roberts, J.Biol.Chem. 220, (1956): 627

7. P. Reichard, B. Estborn, J.Biol.Chem. 188, (1951): 839

8. R.B. Painter, F. Forro, W.L. Hughes, Nature 181 (1958): 328

9. C.P. Leblon, B. Messier, B. Kopriva, Lab.Invest. 8, (1959): 296

10. Fitzgerald P.J., M.L. Eidinoff, J.E. Knoll und E.B. Simmel Science 114, (1951): 494

11. Lajtha L.G., R. Oliver, Lab.Invest. 8, (1959): 214

12. Cronkite E.P., V.P. Bond, T.M. Fliedner und I.R. Rubin, Lab.Invest. 8, (1959): 263

13. Painter R.B., R.M. Drew, W.L. Hughes, Science 127, (1958): 1244

14. Künkel H.A. Strahlentherapie, 118, (1962): 46

15. Hughes W.L. Proc. Sec.UN Int.Conf.on the Peaceful Uses of Atomic Energy Vol.25 Isotopes in Biochemistry and Physiol. Part.2, Genf 1958: 203

16. Stanners C.P., J.E. Till, Biochem. Biophys. Acta 37, (1960): 406

17. Koburg E., W. Maurer, Biochem.Biophys. Acta 61, (1962): 229

18. Hecht L.I., V.R. Potter, Cancer Res. 16, (1956): 988

19. Stern H. Science 124, (1956): 1292

20. Pelc S.R., A. Howard, Rad.Res. 3, (1955): 135

21. Lettré H. Zeitschr.Krebsforsch. 59 (1953)

22. Vendrely R. in Chargaff and Davidson, The Nucleic Acids Bd.2, 158, Academic Press New York 1955

23. Kornberg A., The Chemical Basis of Heredity Balt.1957

24. Pelc S.R., A. Howard, Brit.Med.Bull. 8, (1952): 132

25. Romeis B., Mikroshop.Technik, München 1948, 289

26. Kasten F.H., Int.Rev.Cytology 10, (1960): 4

27. Swift H. in Chargaff and Davidson, The Nucleic Acids Bd.II, 72 Academic Press New York 1955

28. Lajtha L.G. in The Cell Nucleus 126 New York Academic Press 1960

29. Harbers E., Strahlentherapie 112, (1960): 333

30. R.E. Beltz, i. van Lancker, Van R. Potter Cancer Res. 17 (1957): 688

Es ist mir eine angenehme Pflicht Herrn Professor Dr. R. Bauer für die Überlassung des Themas zu vorliegender Arbeit und für die mit Korrektur und Referat verbundene Mühe meinen herzlichen Dank zu sagen.
In besonderer Weise bin ich Herrn Dozent Dr. U. Feine, dem Leiter der Isotopenabteilung des Medizinischen Strahlen-Instituts, für Anregung, Unterstützung und stetes Interesse bei der Ausführung der Arbeit zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 8. Oktober 1938 wurde ich als Sohn des Gymnasialprofessors Dr. rer. techn. Hans Knodel und seiner Ehefrau Lore geb. Scheer in Stuttgart geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule und des Wilhelms-Gymnasiums in Stuttgart legte ich 1957 die Reifeprüfung ab und begann im Sommersemester 1957 in Tübingen mit dem Studium der Medizin.

Im Wintersemester 1959/60 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung und setzte meine klinischen Studien in Kiel, Zürich und Tübingen fort. Im Anschluß an das Wintersemester 1962/63 legte ich in Tübingen das medizinische Staatsexamen ab.